

(19) 日本国特許庁 (J P)

## (12) 公 表 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2000-506152

(P2000-506152A)

(43) 公表日 平成12年5月23日 (2000. 5. 23)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テームト* (参考)
C 0 7 C 229/76		C 0 7 C 229/76	
A 6 1 K 49/00		A 6 1 K 49/00	C
51/00		C 0 7 C 229/16	
C 0 7 C 229/16		237/04	Z
237/04		C 0 7 D 257/02	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 52 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平9-531441  
 (86) (22) 出願日 平成9年3月3日 (1997. 3. 3)  
 (85) 優先文提出日 平成10年9月1日 (1998. 9. 1)  
 (86) 国際出願番号 P C T / E P 9 7 / 0 1 0 4 8  
 (87) 国際公開番号 W O 9 7 / 3 2 8 6 2  
 (87) 国際公開日 平成9年9月12日 (1997. 9. 12)  
 (31) 優先権主張番号 M I 9 6 A 0 0 0 4 5 8  
 (32) 優先日 平成8年3月8日 (1996. 3. 8)  
 (33) 優先権主張国 イタリア (1 T)

(71) 出願人 ブラッゴ・エッセ・ピ・ア  
 イタリア国、イー20134 ミラノ、ヴィ  
 ア・エ・フォッリ、50  
 (72) 発明者 ゴッツィーニ、ルイーダ  
 イタリア国、イー20134 ミラノ、ヴィ  
 ア・エ・フォッリ、50  
 (72) 発明者 マイサノ、フェデリコ  
 イタリア国、イー20134 ミラノ、ヴィ  
 ア・エ・フォッリ、50  
 (72) 発明者 ムッル、マルセラ  
 イタリア国、イー20134 ミラノ、ヴィ  
 ア・エ・フォッリ、50  
 (74) 代理人 弁理士 神国 肇 (外3名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ポリキラント類、金属イオン類とのそれらの錯体類、それらの製造法及びそれらの用途

## (57) 【要約】

本発明は、新しいクラスのポリキラント類、金属イオン類とのそれらのキレート及び生理学的に許容されるそれらの塩類に関し、特殊な距離類、器官類又は体面分類のための一般的又は特異な造影剤として、診断画像化のために、そのまま、又は他の成分と組合せて若しくは配合してのいずれかで用いられる。

## 【特許請求の範囲】

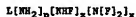
1. ポリキラント／ポリキレート化合物及びそれらの生理学的に適合し得る塩であって、

“m”個（ここで、mは、1～1,000の数である）の第一級アミノ基を有する有機骨格よりなり、該アミノ基類は、“n”個（ここで、nは、2～2mの数である）のキラント／キレート残基類でアルキル化され、該キラント／キレート残基類は、脂肪族鎖によって該アミノ基類に共有結合で結合され、この鎖は、O、N、Sから選ばれるヘテロ原子及び／又はカルボニル、チオカルボニル、アミド、エステル、チオウレア及びチオアミド基から選ばれる基又は芳香族基で中断されているか、又は中断されておらず、そして該アミノ基の数“p”（ここで、pは0～m-1の数である）はアルキル化されておらず、該化合物は、該第一級アミノ基の少なくとも一つが該キラント／キレート残基の二つでジアルキル化され、該結合したキラント／キレート残基の数n及びアルキル化されたアミノ基の数m-pとの間の数の比を表すパラメーターρは、1より大きく2より大きくない、すなわち、

$$1 < \rho \leq 2$$

であることを特徴とする、化合物及びそれらの生理学的に適合し得る塩。

2. 一般式：



〔式中、

Lは、有機の骨格であり、

Fは、 $-(CH_2)_4-T-K$ 残基（ここで、Tは、単結合であるか、又は、O、N、Sから選ばれるヘテロ原子の一つ以上、又はカルボニル、チオカルボニル、アミド、エステル、チオウレア及びチオアミド基から選ばれる官能基、又は芳香族残基により中断されているか、又は中断されていない脂肪族鎖であり、そして該鎖は、残基KのC、O、N又はPの原子に共有結合されており、

Kは、直鎖状若しくは環状の、ポリアミノポリカルボン酸若しくはポリアミノポリホスホン酸若しくはポリアミノポリリン酸若しくはポリアミノポリホスフィ

ン酸のキレート、又はそれらの金属キレートの一つ、又はそれらの塩の一つの残基であり、 $q$ は、 $1 \sim 10$ の整数である）であり、

$p$ は、 $0 \sim m-1$ の数であり、

$z$ は、 $0 \sim m-1$ の数であり、

$x$ は、 $1 \sim m$ の数（ここで、 $m$ は、 $1 \sim 1,000$ の数、そして $m$ は、 $L$ に最初に存在する第一級アミノ基の総数である）であるが、但し、 $p+x+z=m$ であり、そして、キレート化した金属イオンは、2価又は3価の常磁性イオン類又は放射性同位元素類である）で示される化合物。

3.  $L$ が、スベルミジン、ノルスベルミジン、スベルミン、4,9-ジオキサドデカンジアミン、3,6-ジオキサオクタンジアミン、エタノールアミン及び同族体類、ホスファチジルエタノールアミン及びその誘導体類、スフィンゴシン、アルキルアミン類、アルキレンジアミン類、ジエチレントリアミン、トリエチレンテトラミン、トリス（2-アミノエチル）アミン、ジェファミン、 $N$ -グルコサミン、リシン及び誘導体類、オルニチン、グリシン、アミノ酪酸、アミノカプロン酸、タウリン及びその誘導体類、 $[Ly s^3]$ -ボンベシン、インスリン、キモトリプシノーゲンA、ミオグロビン、アルブミン、シトクロムc、分岐状及び直鎖状のポリリシン、分岐状及び直鎖状のポリオルニチン、アミノ糖類、ポリペプチド類、ホルモン類、成長因子類、抗体類より構成される群から選ばれ；

$T$ は、単結合、又は、エステル、アミド又はカルボニルアミノ基を含む脂肪族鎖であり、該鎖は、 $K$ 残基の窒素又は炭素原子に共有結合で結合し、

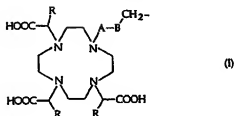
$K$ は、EDTA、DTPA、BOPTA、EOB-DTPA、DOTA、それらの誘導体類、金属キレート類又は塩類よりなる群から選ばれるポリアミノポリカルボン酸の残基であり、

金属イオンキレート類は、原子番号20～31、又は39、42、43、44、49、又は57～83を有する元素の2価又は3価のイオン類、又は次の放射性同位元素類： $^{51}Cr$ 、 $^{67}Ga$ 、 $^{68}Ga$ 、 $^{111}In$ 、 $^{99m}Tc$ 、 $^{140}La$ 、 $^{175}Yb$ 、 $^{153}Sm$ 、 $^{166}Ho$ 、 $^{90}Y$ 、 $^{140}Pm$ 、 $^{177}Lu$ 、 $^{47}Sc$ 、 $^{142}Pr$ 、 $^{159}Gd$ 、 $^{212}Bi$ のイオン類から選ばれる、請求項2記載の化合物。

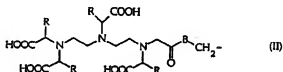
4. 該金属イオン類が、 $Mn^{(2+)}$ 、 $Fe^{(3+)}$ 、 $Gd^{(3+)}$ 、 $Eu^{(3+)}$ 、

Dy<sup>(a)</sup>、<sup>iii</sup> In<sup>(3-)</sup>、<sup>9b</sup> Te<sup>(a)</sup> から選ばれる、請求項3記載の化合物。

5. Fが、式(I)：



又は式(II)：



〔式中、

Aは、単結合又は $-(CH_2)_s$ 、 $R_1-$ （ここで、sは、1～5の整数であり、そして $R_1$ は、単結合、又は、CONH、NHCO、NHCSNH、 $C_6H_4$ NHCSNH、COO、OCO、O若しくはSに等しい）の基に相当し、

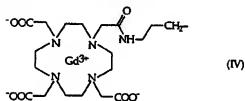
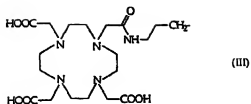
Bは、 $-D-(CH_2)_t$ 、 $-$ （ここで、tは、1～9の整数であり、そしてDは、単結合、又は $-O-$ 若しくは $-NH-$ に等しい）に相当し、

各々の化合物におけるRは、H又は $CH_3$ 又は $CH_2-O-Bz$ 又は下記式：

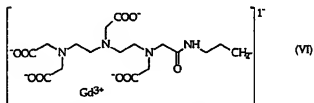
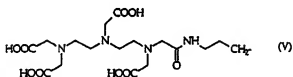


の基又はそれらのいずれかの組合せであってもよい〕のキラント残基、並びに、それらの金属キレート又は塩である、請求項2～4記載の化合物。

6. Fが、式(III)又は(IV)：

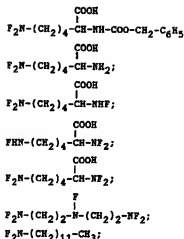


の残基、又は式 (V) 又は (VI) :

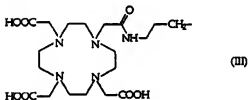


の残基、又はそれらの塩の一つの残基である、請求項5記載の化合物。

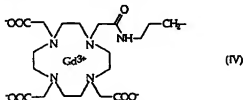
7. 以下の式:



(式中、Fは、式 (III) ) :



のキレート残基、又は式 (IV) :



のキレートである) の化合物、又はそれらの塩よりなる群から選ばれる、請求項 6 記載の化合物。

8. Fが、式 (III) 又は式 (IV) の残基であり、Lが、[Lys<sup>3</sup>] - ボンベシン、インスリン、ミオグロビン、アルブミン、シトクロム c、キモトリプシン

ーゲンA、ポリリシンよりなる群から選ばれる、請求項3及び6記載の化合物。

9. 請求項1記載の化合物を製造する方法であって、

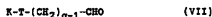
請求項1で定義された脂肪族鎖によって、キラント残基、又はそのキレート、又は塩に結合したアルデヒドで、有機骨格の第一級アミノ基の一つ以上の還元アルキル化による官能基化を含み、アルデヒドが第一級アミノ基の総数に対して3～40倍の過剰モルであることを特徴とする方法。

10. 請求項1記載の化合物を製造する方法であって、

請求項1で定義された脂肪族鎖によって、キラント残基、又はそのキレート、又は塩に結合したアルキレンハロゲン化物で、有機骨格の第一級アミノ基の一つ以上をアルキル化することを含む方法。

11. 請求項2～6記載の化合物を製造する方法であって、

式(VII)：



(式中、K、T、qは、上記と同義である)のキラント化合物、又はキレート、又はそれらの塩と、反応媒体中で還元アルキル化の条件下に、式(VIII)：



(式中、L及びmは、上記と同義である)のポリアミノ化合物との反応を含み、式(VII)の化合物は、第一級アミノ基の数mに対して3～40倍の過剰モルであり、イミン結合には特異的であるが、アルデヒドには特異的でない還元剤の存在下に起こり、そして該還元剤は、第一級アミノ基の総数に関して3～60倍の過剰であることを特徴とする方法。

12. 該反応媒体が、pH5～10の緩衝水溶液、低分子量アルコール類、非プロトン性双極性溶媒、又はこれらの混合溶媒から選ばれる、請求項11記載の方法。

13. 反応温度が、2～170時間中、-5～60℃である、請求項11又は

12記載の方法。

14. 式(VII)のキレート、又はその塩の一つが、アミノ基の総数に関して約10～35倍の過剰モルで用いられ；

反応媒体が、pH7～9の緩衝水溶液、又はメタノール、又はこの二つの混合溶媒であり；

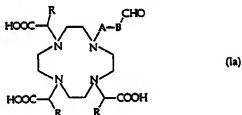
還元剤が、水素化シアノホウ素ナトリウムであり；

温度が、15～30℃の間で可変であり；

反応時間が、10～72時間である、請求項11～13記載の方法。

15. 還元アルキル化反応が、式(VII)のキレート及びポリアミノ残基L(NH<sub>2</sub>)<sub>s</sub>の間で起こり、次いで、関連する金属錯体及び/又はその塩類の一つを形成する、請求項11～13記載の方法。

16. 式(Ia)：



〔式中、

Aは、単結合又は $-(CH_2)_s$ 、R<sub>1</sub>-基（ここで、sは、1～5の整数であり、そしてR<sub>1</sub>は、単結合、又は、CONH、NHCO、NHCSNH、C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>NHCSNH、COO、OCO、O若しくはSに等しい）に相当し、

Bは、 $-D-(CH_2)_t-$ にここで、tは、1～9の整数であり、そしてDは、単結合、又は $-O-$ 、 $-NH-$ に等しい）に相当し、

各々の化合物におけるRは、H又はCH<sub>3</sub>又はCH<sub>2</sub>-O-Bz又は下記式：



の基又はそれらのいずれかの組合せであってもよい〕の中間体及びそれらの金属

キレート類及びそれらの塩の製造法であって、以下の工程：



一保護されたアルデヒド $X-A-B-Y$ （ここで、 $A$ 及び $B$ は、上記と同義であり、 $X$ は、ハロゲン、 $OTs$ 、 $OMs$ 、 $OTf$ から選ばれる脱離基であり、そして $Y$ は、酸の環境で脱離しやすい保護基、例えば、1, 3-ジオキソラン及び1, 3-ジオキサンで保護されたアルデヒドである）の製造工程；

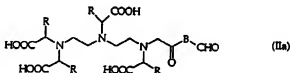
一 $TAZA$ と該保護されたアルデヒドの $X$ 基とを反応させて、相当する1:1の縮合生成物を生成させる工程；

一 $\alpha$ - $R$ -プロモ酢酸（ここで、 $R$ は、上記と同義である）との縮合、次いでアルデヒド官能基の脱保護工程；

一上記の工程で得られた式(Ia)のキラントと、塩又は酸化物の形態における金属との、かつ中性塩を得るために必要な量の塩基又は酸の存在下又は不存在下における反応による、金属錯体及び／又はその塩の形成工程；

を含むことを特徴とする方法。

17.式(IIa)：



〔式中、

$B$ は、 $-D-(CH_2)_t$ 、 $-$ （ここで、 $t$ は、1～9の整数であり、そして $D$ は、単結合、又は $-O-$ 若しくは $-NH-$ に等しい）に相当し、

各々の化合物における $R$ は、 $H$ 又は $CH_3$ 又は $CH_2-O-Bz$ 又は下記式：



の基又はそれらのいずれかの組合せであってもよい〕の中間体及びそれらの金属キレート及びそれらの塩を製造する方法であって、

以下の工程：

一保護されたアルデヒド $X-B-Y$ （式中、 $X$ は、脱離基を表し、 $Y$ は、保護さ

れたアルデヒドであり、そして、 $B$ は、上記と同義である）の製造工程；

- 保護されたアルデヒド  $H_2N-B-Y$  を与える、Xのアミンへの変換工程；
- ジエチレントリアミン五酢酸のR誘導体の二無水物と、上記で製した保護されたアルデヒドとの間の縮合工程；
- 保護されたアルデヒドの脱保護工程；
- 錯体の形成工程、を含むことを特徴とする方法。

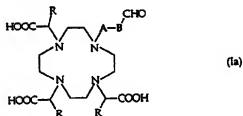
18. 請求項1～8記載の化合物の少なくとも一つ、又はそれらの生理学的に適合し得る塩の一つを、活性成分として含む、薬学及び／又は診断用配合物。

19. 放射線療法で使用する薬学組成物を製造するための、生理学的に適合し得るキレート又は塩の形態での、請求項1～8記載の化合物の用途。

20. NMR画像化用造影剤を製造するための、生理学的に適合し得るキレート又は塩の形態での、請求項1～8記載の化合物の用途。

21. シンチグラフィ用造影剤を製造するための、請求項1～8記載の化合物の用途。

22. 請求項5～8記載の化合物を製造するための中間体としての用途のための、式(Ia)：



〔式中、

Aは、単結合又は  $-(CH_2)_s$ 、 $R_1-$ （ここで、sは、1～5の整数である）基に相当し、

$R_1$ は、単結合、又は、CONH、NHCO、NHCSNH、 $C_6H_4$ NHCSNH、COO、OCO、O若しくはSに等しく、

Bは、 $-D-(CH_2)_t-$ 、（ここで、tは、1～9の整数であり、そしてDは、

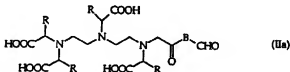
単結合又は-O-若しくは-NH-に等しい)に相当し、

各々の化合物におけるRは、H又はCH<sub>3</sub>又はCH<sub>2</sub>-O-Bz又は下記式：



の基又はそれらのいずれかの組合せであってもよい)の化合物。

23. 請求項5〜8記載の化合物を製造するための中間体としての用途のための、式(IIa)：



[式中、

Bは-D-(CH<sub>2</sub>)<sub>t</sub>- (ここで、tは、1〜9の整数であり、そしてDは、単結合又は-O-、-NH-に等しい)に相当し、

各々の化合物におけるRは、H又はCH<sub>3</sub>又はCH<sub>2</sub>-O-Bz又は下記式：



の基又はそれらのいずれかの組合せであってもよい)の化合物。

## 【発明の詳細な説明】

ポリキラント類、金属イオン類とのそれらの錯体類、

それらの製造法及びそれらの用途

本発明は、新しいクラスのポリキラント類、それらの金属イオン類とのキレート類及びそれらの生理学的に許容される塩類に関し、これらは、特別な組織、器官又は体区画のための一般的又は特異な造影剤として、診断画像化用に単独、又は他の成分と組み合わせて若しくは配合物としてのいずれかで用いられる。

この新しいクラスの造影剤は、キラント又は金属イオンのキレートを、該キラント／キレートがアルキレン架橋を経て一つ以上の第一級アミノ基を有する有機の「骨格」よりなる「担体」に共有結合することによって得られる分子又は高分子によって構成される。このクラスは、「担体」の少なくとも一つ、又は、好適には、二つ以上の第一級アミノ基が、該キラント又は金属キレート又はこれらの塩を有するアルキレン残基によって二官能基化され、他方、残りのいずれかの第一級アミノ基は、遊離の形（塩化されているか、若しくは塩化されていない）又は該キラント／キレート残基で一官能基化されている事実によって特徴付けられている。このクラスの造影剤は、一般に、担体に存在する第一級アミノ基に結合している、一分子当たり高い数のキラント／キレートを有している。実際に、この担体の構造及び該アミノ基の反応性により異なるが、2個までのキラント／キレート残基は、それぞれの第一級アミノ基に結合することができる。

この発明は、該分子の製造法、及びそれらの用途にも関する。

キレート化剤及び適切な金属イオンから形成される錯体は、核医学及び磁気共鳴画像化（MRI）の両者に使用される。核医学において、放射性金属キレートは、診断（シンチグラフィ、PET又は陽電子放出断層撮影法）及び治療の両者に用いられる。核医学において、例えば抗体のような高い生物特異性を有する高分子及び、比較的最近では、ポリペプチドが広く使用されている。この後者の場合、ポリペプチドは、生物学的に活性なポリペプチドの類似化合物（アゴニスト及びアンタゴニストの両者）である。この研究方法の一例は、オクトレオスカン（Octreoscan）、及び神経内分泌起源の腫瘍を可視化及び局在化するために開発された<sup>111</sup>In<sup>650</sup>の錯体を含むソマトスタチン誘導体である。これらの誘

導体によって提起される問題は、担体（アドレスとも言われる）高分子の本来の生物活性に関し、その用量は、認め得る薬理作用を呈することなしに、調査している器官の改良された可視化を提供するようなものでなければならない。担体分子に、診断的に有効な部位数を増加させる可能性は、同じ診断効果を得るのに要求される用量の低下、したがって、その分子の薬理学的活性に関連した望ましくない作用の可能性を低下させる。この問題は、アミノ基、特に受容体認識又は生物学的活性に要求されるアミノ基の数を変更しないことが必要な場合に、比較的重要になる。例えば、インスリンのB29位にあるリシンの $\epsilon$ -アミノ基は、生物学的活性を弱めることなしに改質されるが、 $\alpha$ -アミノ基は、活性を変更することなしには改質されないことが知られている。本発明は、アミノ基置換の度合いを最大して、この問題を回避することができ、かくして、例えばMRIのような、低い感度によって特徴付けられている診断技術に非常に有利である。

MRIのための生物特異性の造影剤の製造において、最も一般的な研究方法は、第一に、蛋白及びポリリシンのような高分子を、リシンの $\epsilon$ -アミノ基と抱合し得る官能基を有するキレート化剤と反応させ、好適にはアミド又は類似的結合を形成させ、次いで生成した化合物をガドリニウムと錯体化することである（例えば、Ogan et al., Invest. Radiol., 1987, 22, 665-671）。しかしながら、この研究方法では、担体のアミノ基当り1個以上のキラント単位を結合することは可能でなかった。実際に、蛋白当りのキラント基の総数は、分子上での理論的に官能基化され得るアミノ基の総数と比較した場合に、一般に極端に低い。例えば、ルイスら（Lewis et al.）は、N-ヒドロキシスルホスクシンイミドによる活性化を経て、シトクロムcへの造影剤DOTA（1, 4, 7, 10-テトラアザシクロドデカン-N,N',N'',N'''-四酢酸）の抱合を報告している（Bioconj.Chem., 1994, 5, 565-576）。DOTAの活性エステルとシトクロムcとのモル比を10:1から100:1に増加すると、19個の利用できる第一級アミノ基の総数の、キレート化される蛋白に結合した基の平均数は2.64から8.79に増加することになる。

更に、ガドリウムと引き続く錯体形成は、同じことが定量的に起こることを保証しない。全体の結果は、全部ではなく、アミノ基がキレート化される基で官能

基化されること、及び全部ではないが導入されたキレート化される基がガドリニウムで飽和されることである。この技術分野の状態は、いずれも、可能な最大のキレート化を得るような方法で、形成されたキレート又はそれらの塩で、問題の高分子の遊離アミノ基を直接結合することを教示していない。この点で、例えば、以下の資料を引用することが可能である：米国特許第4,855,353号、欧州特許第A-481526号、欧州特許第A-243929号、欧州特許第A-255471号、WO第9514491号、英国特許第B2169598号、欧州特許第A-038546号、WO第9014881号。結果として、該造影剤の診断的に至適な用量は多量の高分子担体を含み、その結果、望ましくない生物学的作用が起こり得る。実質的に低い用量の高分子担体を有する金属キレートの有効な用量を輸送できることが強く望まれている。

本発明は、担体構造上に存在する第一級アミノ基のそれぞれに、キラントの2単位まで、又は、より良好には、その金属錯体を直接に結合させることによって、この問題を解決する。この構造は、例えば、蛋白のような高分子、ポリマー又はペプチド、アミノ酸又は単純なアミン又はポリアミンでさえあり得る。この発明のこの点は、アドレス分子の一つ以上の第一級アミノ基が、生物活性又は組織器官特異性を保持するように（例えば、適切で容易に除去される保護によって）維持されなければならない場合に、特に有用である（上記で引用したインスリンの場合を参照）。これらの場合においても、適切なキラント／キレート基を有する担体の他の第一級アミノ基の、本発明の教示によるジアルキル化は、この技術分野の現在の状態によって得られるそれよりも大きく、分子当たり多数の診断的又は治療的活性部位を生じる。

同じことはポリアミノ担体にも言われ、この場合、例えば、第一級アミノ基は等しく立体的に受け入れられないので、それらは、全部ではないが改質される。この場合にも、また、反応性の第一級アミノ基当りの二つのキラント／キレート残基を結合する可能性は、現在の既知の方法によって得られるものよりも効果的に、最終生成物が得られるようになる。この技術状態からの一例は、上記で引用した特許出願WO第9514491号によって与えられ、この特許は内皮構造を選択的に可視化できるように1:1イオン対のGd-DTPA-リシン及びデルマトン硫酸（ページ77の実施例において）に基づいた診断薬の製造を報告している。

この場合にも、キラント／キレート残基及びリシン上のアミノ基の間の比は1よりも大きい(二つのリシンの第一級アミノ基に対して、実際に唯一つのキレート残基が存在する)。対照的に、本発明の方法により、少なくとも二つのアミノ基の一つに、二つのキラント／キレート残基、又は第一級アミノ基のそれぞれ一つに、二つのキラント／キレート残基(2個のアミノ基に対して総計4個のキラント／キレート基、下記の実施例3～6を参照)を有するリシン誘導体を得ることが可能であり、次のような利点がある：

- a) 同じ診断効果を得るために必要なデルマトン硫酸の量は、少なくとも半分であり、したがって、その抗凝血作用も半分であり、
- b) 生成したイオン対は、この場合、アミノ基が(WO第9514491号におけるように)アシル化されず、アルキル化されるので、リシン誘導体の高い陽電荷によって安定化される。

更に、本発明は、G d イオン数に基づいて計算した場合にも、一重キレートの値よりも増加した緩和度  $r_1$  を有する多重G d キレートへの利用を許す。キレートが高分子にグラフトされる場合に、 $r_1$  における増加が期待される；例えば、ガドリニウム基準当り  $r_1 = 19 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$  を有する、実施例12のミオグロビン抱合体は、G d-DOTAの  $r_1$  値(文献上で  $3.4 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ；例えば、Lauffer R.B. (1990) Magn. Reson. Quart. 2, 65-84)と比較される。しかしながら、本発明者は、緩和性が大きく、比較的低分子量の多重G d キレートを調製することも可能であることを示す(参照：実施例6のリシン誘導体、その緩和性は、ガドリニウム基準当りG d-DOTAの3.4から  $8.35 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$  に2倍以上である)。この効果は、キレート化したG d イオンの増加数と組み合わせる時、非常に高い分子の緩和性が得られ、効果的な用量の必然的な実質的低下を伴う。

したがって、本発明の目的は、m個(mは1～1,000の数である)の第一級アミノ基を有する有機の骨格から誘導される新しいクラスのポリキラント／ポリキレート及び、それらの生物学的に適合し得る塩であり、該アミノ基は、n個(nは2～2mの数である)のキラント／キレート残基でアルキル化され、該キラント／キレート残基は、脂肪族鎖によって該アミノ基に共有結合され、この鎖は、O、N、Sから選ばれるヘテロ原子、又は、カルボニル、チオカルボニル、

アミド、エステル、チオウレア及びチオアミドから選ばれる基又は芳香族基で中断されているか又は中断されておらず、 $p$ 個 ( $p$ は、 $0 \sim m-1$ の数である)の該アミノ基は官能基化されず、該化合物は、該第一級アミノ基の少なくとも一つが、2個の該キラント/キレート残基でジアルキル化される事実によって特徴付けられる。

結果として、分子上のキラント/キレート残基の数 ( $n$ ) は、アルキル化された第一級アミノ基 ( $m-p$ に相当する) よりも常に大きい。数式で、この状態は、次の不等式:

$$n > m - p,$$

(式中、 $m$ 、 $n$ 及び $p$ は、上記の意義を有する) によって表される。

換言すれば、「担体」に挿入されたキラント/キレート残基の数及びアルキル化(モノ及びジアルキル化)された第一級アミノ基の総数との間の比として $\rho$ を定義すると、該比は1よりも常に大きくなければならない、すなわち:

$$\rho = n / (m - p) > 1.$$

更に、第一級アミノ基当りのキラント/キレート基の最大の可能な数は2であるので、 $\rho$ も、また、この値より大きくはあり得ないが、次のようになる:

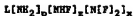
$$1 < \rho \leq 2$$

このパラメーター $\rho$ は、キラント/キレート残基を担体の第一級アミノ基に結合させる化学結合の型と一緒に、この発明の主要な特性値であり、 $\rho$ が常に1である技術状態から同じものを区別する。

20~31、又は39、42、43、44、49、又は57~83の原子番号を有する元素の2価又は3価のイオンと、各種キラントの錯体、及びそれらの生理学的に適合し得る塩も本発明の一部である。特に、 $\text{Fe}^{(2+)}$ 、 $\text{Fe}^{(3+)}$ 、 $\text{Cu}^{(2+)}$ 、 $\text{Cr}^{(3+)}$ 、 $\text{Gd}^{(3+)}$ 、 $\text{Eu}^{(3+)}$ 、 $\text{Dy}^{(3+)}$ 、 $\text{La}^{(3+)}$ 、 $\text{Yb}^{(3+)}$  若しくは  $\text{Mn}^{(2+)}$ 、又は以下の放射性同位元素  $^{51}\text{Cr}$ 、 $^{67}\text{Ga}$ 、 $^{68}\text{Ga}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{90}\text{Tc}$ 、 $^{140}\text{La}$ 、 $^{175}\text{Yb}$ 、 $^{152}\text{Sm}$ 、 $^{166}\text{Ho}$ 、 $^{30}\text{Y}$ 、 $^{140}\text{Pm}$ 、 $^{177}\text{Lu}$ 、 $^{47}\text{Sc}$ 、 $^{142}\text{Pr}$ 、 $^{159}\text{Gd}$ 、 $^{212}\text{Bi}$ は好ましい。

したがって、本発明の目的は、下記式:





〔式中、Lは、有機の骨格であり、

Fは、 $-(CH_2)_4$ 、 $-T-K$ 残基（ここで、Tは、単結合、又は、O、N、Sから選ばれる一つ以上のヘテロ原子、又はカルボニル、チオカルボニル、アミド、エステル、チオウレア若しくはチオアミド基から選ばれる官能基又は芳香族残基で中断されているか、又は中断されていない脂肪族鎖であり、該鎖は、残基KのC、O、N又はP原子に共有結合され、

Kは、直鎖状又は環状のポリアミノポリカルボン酸若しくはポリアミノポリホスホン酸若しくはポリアミノポリリン酸若しくはポリアミノポリホスフィン酸のキラントの残基、又はその金属キレートの前残基若しくはその塩の前残基であり、

qは、1～10の整数である）であり、

pは、0～m-1の数であり、

zは、0～m-1の数であり、

xは、1～mの数であり（ここで、mは、1～1,000の数であり、mは、Lに由来する第一級アミノ基の総数であるが、但し、 $p+x+z=m$ である）であり、そして

キレート化金属イオンは、2価又は3価の常磁性イオン又は放射性同位元素である〕のポリキラント又はポリキレート及び生物学的に許容される塩である。

好ましい化合物の第一のクラスは：

Lが、スベルミジン、スベルミン、ノルスベルミジン、4, 9-ジオキサドデカンジアミン、3, 6-ジオキサオクタンジアミン、エタノールアミン及びその同族体類、ホスファチジル-エタノールアミン及びその同族体類、スフィンゴジン、アルキルアミン類、アルキレンジアミン類、ジエチレントリアミン、トリエチレンテトラミン、トリス（2-アミノエチル）アミン、ジェファミン、N-グルコサミン、リシン及び誘導体類、オルニチン、グリシン、アミノ酪酸、アミノカブロン酸、タウリン及びその誘導体類、 $[Lys^3]$ -ボンベシン、インスリン、キモトリプシノーゲンA、ミオグロビン、アルブミン、シトクロムc、分岐状及び直鎖状のポリリシン、分岐状及び直鎖状のポリオルニチン、アミノ糖類、

ポリペプチド類、ホルモン類、成長因子類、抗体によりなる群から選ばれ；

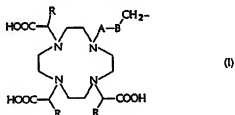
Tは、単結合、又は、エステル、アミド若しくはカルボニルアミノ基を含む脂肪族基であり、該鎖は、

K残基の窒素又は炭素原子に共有結合され；

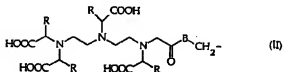
Kは、EDTA、DTPA、BOPTA、EOB-DTPA、DOTA、それらの誘導体類、それらの金属キレート類又は塩類よりなる群から選ばれるポリアミノポリカルボン酸の残基である、化合物よりなり、

一金属イオンキレートは、20～31、又は39、42、43、44、49、又は57～83の原子番号を有する元素の2-又は3価のイオン、又は、以下の同位元素：<sup>51</sup>Cr、<sup>67</sup>Ga、<sup>68</sup>Ga、<sup>111</sup>In、<sup>99m</sup>Tc、<sup>140</sup>La、<sup>175</sup>Yb、<sup>153</sup>Sm、<sup>166</sup>Ho、<sup>90</sup>Y、<sup>149</sup>Pm、<sup>177</sup>Lu、<sup>47</sup>Sc、<sup>142</sup>Pr、<sup>159</sup>Gd、<sup>212</sup>Biのイオンから選ばれる。

第二のクラスの好ましい化合物は、Fが、式(I)：



又は式(II)：



[式中、

Aは、単結合、又は、 $-(CH_2)_s$   $R_1$ -基(ここで、sは、1～5の整数であり、 $R_1$ は、単結合、又は、CONH、NHCO、NHCSNH、

$C_6H_4$ 、NHCSNH、COO、OCO、O、Sに等しい)に相当し、

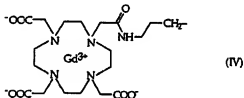
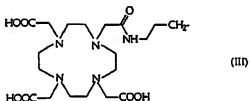
Bは、 $-D-(CH_2)_t-$ （ここで、 $t$ は、1～9の整数であり、Dは、単結合、又は、 $-O-$ 、 $-NH-$ に等しい）に相当し、

各々の化合物におけるRは、H若しくは $CH_3$ 若しくは $CH_2-O-Bz$ 又は下記式：

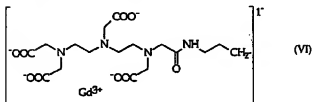
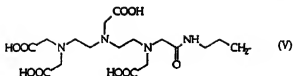


の基若しくはそれらのいずれかの組合せであってもよい）のキラント残基である化合物、並びに、それらの金属キレート又はそれらの塩である。

第三のクラスの好ましい化合物は、式 (III) 若しくは (IV)：

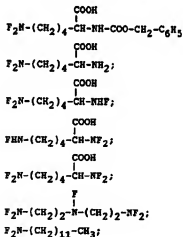


は式 (V) 若しくは (VI)：



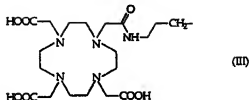
又はそれらの塩の残基である。

第四のクラスの好ましい化合物は、以下の化合物：

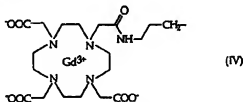


(上記式中、

Fは、式 (III)：

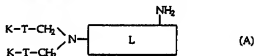


のキラント残基、又は式 (IV) :



のキレート、又はそれらの塩である)である。その他の好ましい化合物は、Fが式 (III) 又は (IV) の残基であり、Lが、[Lys<sup>3</sup>]ーボンベシン、インスリン、ミオグロビン、アルブミン、シトクロムc、キモトリプシノーゲンA、ポリリシンによりなる群から選ばれる化合物である。

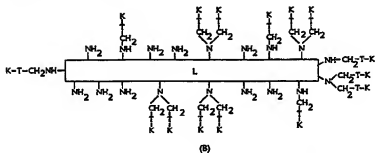
この発明の化合物の構造を明らかにするために、例として、下記の式 (A) :



(式中、L、K、Tは、上記と同義である)において、本発明の目的であるポリキラント/ポリキレート誘導体の構造が図式化される。式 (A) で図式化された生成物は、2個の第一級アミノ基を有し ( $m=2$ )、その一つは2個のK-T-CH<sub>2</sub>ー残基でジアルキル化された有機の骨格(L)から出発して得られる。したがって、得られた化合物は、窒素原子上に二つのキラント/キレート部分 ( $n=2$ ) 及び一つの遊離アミノ基 ( $p=1$ ) を有している。 $m-p$ は1に等しいので、したがって  $n > m-p$  である。結果として、 $p=2$  である。この型の生

成物は、実施例4に記載されている。

同様に、下記の式 (B) :



において、本発明の目的であるポリキラント／ポリキレート構造が、図式化され、19個の第一級アミノ基を有する ( $m=19$ ) ポリアミンの有機の骨格 (L) から出発して得られる。

該骨格 (L) は、15個の  $K-T-CH_2$ -残基でアルキル化された。得られた化合物は、9個の遊離アミノ基 ( $p=9$ ) 及び総計で15個のアルキレン基 ( $n=15$ ) を有する。 $m-p$ は10に等しいので、したがって  $n>m-p$  及び  $p=1.5$ 、すなわち  $>1$  である。この型の生成物は、実施例10に記載されている。

本発明の化合物は、例えば、この技術分野に精通している技術者に既知であるいずれかの合成法によって、アルキルハロゲン化物によるアルキル化のような第一級アミンのアルキル化で得られる。それにもかかわらず、本発明者は、驚くべきことであるが、この技術分野の状態で広く行われている教養とは対照的に、還元アルキル化も有用な方法であり、この発明の目的である第三級アミンの製造に特に有効であることを発見した。実際、膨大な文献が存在し (G.E.Meares & R.E.Feeney, Anal. Biochem. 224, 1-16, 1995)、その中に、適切な還元剤の存在下に、各種のアルデヒドと蛋白との結合に還元的アルキル化の使用が記載されている。しかしながら、一般的には、ホルムアルデヒドの唯一の例外はあるが、第三級アミンの形成は観察されていない。これは、アミンとアルデヒドの間の相互の立体障害に起因するものである。最近、グリシンのような余り立体障害を受けて

いないアミンでは、第三級アミンの形成が反応の副生成物として起こり得るが、非常に低い率であることが報告されている(J.-P.Sanietal., Tetrahedron Lett. 35, 1181-1184, 1994)。キレート化剤のアルデヒド誘導体による蛋白の還元アルキル化が記載されている極く最近の論文においてさえも、各種の実験パラメーターの注意深い至適化にも拘らず、二重のアルキル化は報告されていない(V.V.Sonayaji et al., Appl. Radiat. Isot. 47(1), 71-77, 1996)。これに反して、本発明者は、驚くべきことであるが、特別な実験条件の下では、二つの試薬の立体障害は、もはや制限因子でないことを発見した。すなわち、第三級アミンは、大きなアルデヒドが原料として用いられ、第一級アミノ基が高分子に属している場合にも好収率で得られる。

一般に、上記のような脂肪族鎖によって、キラント残基、又はそのキレートの一つ、若しくは塩に結合されたアルデヒドは、第一級アミノ基の数の3~40倍の過剰モルであることが重要である。

特に、本発明の方法は、式(VII)：



(式中、

K、T、qは、上記と同義である)のキラント化合物、又はそのキレート又は塩の一つと、式(VIII)：



(式中、

L及びmは、上記と同義である)のポリアミノ化合物との反応であり、反応媒体中、i) 式(VII)の化合物が、m個の第一級アミノ基に関して3~40倍の過剰モルであり、ii) 反応が、イミン結合に特異的であるが、アルデヒドには特異的でない還元剤の存在下で行われる事実によって特徴付けられる還元アミノ化の条件下に行われ、還元剤は、原料の第一級アミノ基に関して3~60倍の過剰である。

好適には、該反応媒体は、以下の媒体：pH 5~10の緩衝水溶液、低分子量ア

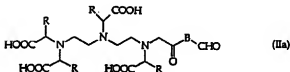
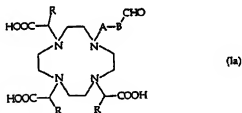
ルコール、非プロトン性双極性溶媒、又はこれらの混合溶媒から選ばれ、反応温度は、2～170時間の長さにより異なるが、-5～60℃である。

本発明の方法の、第一の特に好ましい実態は、

- 第一級アミノ基の総数に関して、約10～35倍の過剰モルでの式(VII)の金属キレート化合物、又はその塩の一つの使用；
- 反応媒体は、pH7～9の緩衝水溶液、又はメタノール、又はこの二つの混合溶媒である；
- 還元剤は、水素化シアノホウ素ナトリウムである；
- 温度は、15～30℃の間で変わる；
- 反応時間は、10～72時間である。

本発明の方法の、第二の特に好ましい実態において、還元アルキル化反応は、上記のように、式(VII)のキラントと式(VIII)のポリアミノ化合物との間で起こり、次いで、関連する金属錯体及び/又はその塩の一つが形成する。

本発明の化合物の製造に好ましい中間体のアルデヒドは、下記の式(Ia)又は式(IIa)：



[式中、

Aは、単結合、又は-(CH<sub>2</sub>)<sub>s</sub>、R<sub>1</sub>-基(ここで、sは、1～5の整数



であり、 $R_1$ は、単結合であるか又はCONH、NHCO、NHCSNH、C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>、NHCSNH、COO、OCO、O、Sに等しい)に相当し、

Bは、 $-D-(CH_2)_t-$  (ここで、 $t$ は、1～9の整数であり、Dは、単結合であるか又は $-O-$ 、 $-NH-$ に等しい)に相当し、

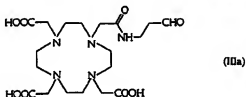
Rは、H、又は、 $-CH-O-Bz$ 若しくは下記式：



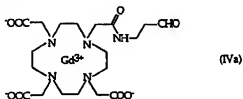
の基であるが、但し、R置換基の一つだけは水素でなくてもよい]の化合物であり、該化合物(Ia)及び(IIa)は、上記の金属イオンから選ばれる2価又は3価の金属イオンを有するキラント又は錯体としてのいずれか、又はそれらの塩の一つである。

式(IIIa)～(VIa)の以下の中間体は特に好ましい：

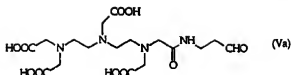
10-[2-オキソ-2-[(3-オキソプロピル)アミノ]エチル]-1,4,7,10-テトラアザシクロデカン-1,4,7-三酢酸(IIIa)：



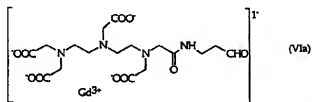
及びその関連する式(IVa)：



のガドリニウム錯体、3,6,9,12-テトラアザ-11,15-ジオキソ-3,6,9-トリス(カルボキシメチル)ペンタデカン酸(Va)：



及びその関連する式 (VI a) :



のガドリニウム錯体、及びそれらの塩。

式 (I a)、(II a) のキラント類、又はそれらの金属錯体類が挿入される、特に好ましい担体は、アミノ誘導体類、例えば、第一級アミン類及びポリアミン類、アミノ酸類、ポリペプチド類、ポリアミノ酸類、蛋白類、抗体類、アミノ糖類及び第一級アミノ基類又はそれらの誘導体類を含む直鎖状又は分岐状のポリマー類である。

特に好ましいアミン類は、例えば、スベルミジン、スベルミン、エタノールアミン、ホスファチジル-エタノールアミン及びその誘導体類、スフィンゴシン、ジエチレントリアミン、アルキルアミン類、アルキレンジアミン類、トリス(2-アミノエチル)アミン、ジェファミン、N-グルコサミンである。

特に好ましいアミノ酸類は、リシン、オルニチン、グリシン、4-アミノ酪酸、アミノカブロン酸、タウリンである。

特に好ましい高分子は、 $[Ly s^3]$ -ボンベシン、インスリン、キモトリプシノーゲンA、ミオグロビン、アルブミン、シトクロムc、分岐状及び直鎖状のポリリシン類、分岐状及び直鎖状のポリオルニチン、ホルモン類、成長因子類である。

式 (IV a) 及び (VI a) の化合物類と、上記で定義されたアミノ誘導体類との

反応によって得られる生成物類は、特に好ましい。

この発明の好ましい中間体類の製造は、以下のスキーム1及び2に略記され、これらの場合、式(I a)及び(II a)の化合物において、R基はHに等しく、基Aは、それぞれ、 $-\text{CH}_2\text{CONH}-$  (I bを経て)及び単結合 (I aを経て)に相当し、Bは、式(I a)及び(II a)で上記に定義されたものである。

#### スキーム1



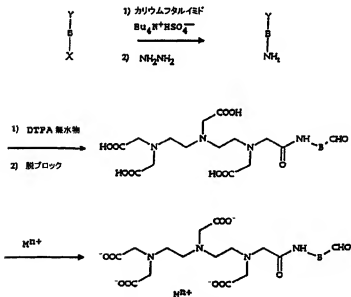
で不安定な保護基から好適に選ばれる保護基、特に1, 3-ジオキソラン及び1, 3-ジオキサン誘導体で保護されたアルデヒドである]に相当する、遮蔽されたアルデヒド構築単位の製造、

—T A Z A (1, 4, 7, 10-テトラアザシクロデカン) 及び上記で製したアルデヒド基単位の反応で、1:1アルキル化生成物の生成、

—プロモ酢酸との反応及び保護されたアルデヒドの同時的な脱保護を行い式(I a) (式中、R=H) のキラント剤の生成、

—塩又はオキシド型のいずれかで、多分、中和に必要な塩基又は酸の存在下、金属イオンのキレート化によって、好適には、式(I a) のキラント剤を金属と反応させて、所望の金属錯体及び／又はそれらの塩を形成させ、関連する金属錯体の生成。

スキーム 2



スキーム 2 に示した方法は、以下のように要約される：

—式  $\text{X}-\text{B}-\text{Y}$  (ここで、X は、ハロゲン、OTs、OMs、OTf による

群から好適に選ばれる脱離基であり、Yは、酸性のpHで不安定な保護基から好適に選ばれる保護基、特に1, 3-ジオキソラン及び1, 3-ジオキサンの誘導体で保護されたアルデヒドであり、そしてBは、上記と同義である)に相当する、遮蔽されたアルデヒド構築単位の製造；

—Xをアミンに変換し、カルボニルが保護された $H_2N-B-CHO$ -保護基の生成；

—市販で入手されるDTPA（ジエチレントリアミン五酢酸）の二無水物と、上記で製したアルデヒド単位との縮合；

—保護されたアルデヒドを脱保護して式(IIa)（式中、 $R=H$ ）のキラント化剤の生成；

—スキーム1に記載と同様に、錯体及びそれらの塩の可能な形成。

この技術状態の一般化された教示とは異なり、驚くべきことであるが、それぞれのキラントでよりも、式(Ia)及び(IIa)のキラントの金属錯体で、上記のアミノ又はポリアミノ担体を直接に高収率で抱合することが可能であるばかりでなく、実際に好都合であることが分かった。これは、得られた生成物が次の錯体化の段階を必要としないので、特に有利である。この方法で、錯体への不完全なそして／又は非特異的な取込みは避けられる。更に、潜在的に分解の可能性がある生成物は、錯体化に要求される往々にして非常に激烈な条件を受ける必要がない。最終的に、最終生成物の精製を実施するのが遙かに簡単である。

本発明の目的であるポリキラント／ポリキレート製造のための還元アルキル化反応は、以下の指標によって起こる：

—問題の担体の第一級アミノ基の総数に関して3～40倍、好適には10～35倍の過剰で、アミノ担体又はその塩の一つと、式(Ia)又は(IIa)のキラント又はそれらの金属錯体の一つの反応；

—反応媒体は、一般に、リン酸塩、ホウ酸塩、重炭酸塩、炭酸塩、酢酸塩などのようなpHが5～10である水性緩衝液；又は、例えば、メタノール、エタノール、プロパノール類、ブタノール類のような低分子量のアルコール；又は、例えば、DMF、DMSO、DMAのような非プロトン性双極性溶媒よりなり；上記

の溶液のような緩衝水溶液との混合媒体も可能であり、場合によっては好ましい；

—反応は、イミン結合に特異的であるが、アルデヒドには特異的でない還元剤の存在下、原料のアミノ担体のアミノ基に関して3～60倍の過剰で起こり、しかるに、該還元剤の好ましい例は、水素化シアノホウ素ナトリウム( $\text{NaCNBH}_3$ )、ピリジンボラン、トリメチルアミンボラン及び類似化合物である；

—反応温度は、 $-5 \sim 60^\circ\text{C}$ 、好適には $15 \sim 30^\circ\text{C}$ である；

—反応時間は、2～170時間と異なるが、好適には10～72時間である。

特に好ましい緩衝液は、pH値が7～9であるリン酸及びホウ酸の緩衝液である。好ましい溶媒類は、メタノール、DMF及びDMSOである。反応媒体中の

アミノ担体の濃度は、0.1～40% (w/v) である。好ましい還元剤は、水素化シアノホウ素ナトリウムである。

明らかに、還元アルキル化反応が、アミノ担体と共に式(Ia)又は(IIa)のキラントを原料として行われる場合、次の段階は、既知の方法及び技術による、関連する金属錯体の形成である。

アルキル化の他の方法と対照して、還元アルキル化の更に予想外の利点は、別の反応性基を含む蛋白及びアミノ誘導体に応用される反応の特異性に関する。この反応の特異性は、例えば、蛋白で確かめられている。

全ての場合に、改質された蛋白のアミノ酸の分析は、リシン残基及び、場合によっては、アミノ末端を有するアミノ酸を除いて原料の蛋白のそれと同一であることが示された。式(Ia)及び(IIa)の化合物又はそれらの金属錯体が、他のアミノ酸の側鎖と反応し、加水分解生成物(これはアミノ酸分析に際して同定ができない)を生ずる可能性は排除される。

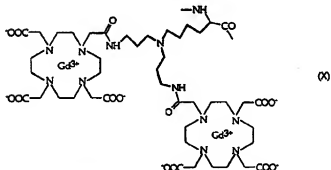
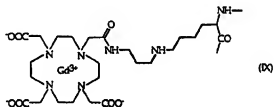
実際、式(IVa)のガドリニウム錯体は、例えば、遊離の第一級アミノ基のないペプチドモデルと反応しなかった。この実験は、pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-アミドの配列順序及び分子量1182.3を有する、アミノ末端基が保護されたペプチド、黄体形成ホルモン(LHRH)で行われた。質量分析は、蛋白の改質に用いた条件下、

式(IVa)のガドリニウム錯体との反応後に質量が変化しないことを示した。

対照的に、本発明のために選ばれた蛋白と、式(IVa)のガドリニウム錯体の反応によってられる生成物は、理論的に得られるアミノ基( $\alpha$ 及び $\epsilon$ )の数よりも大きい多数の錯体残基を含んでいる。

したがって、( $\alpha$ 及び $\epsilon$ )アミノ基の大部分は、二重のアルキル化を受ける。

例えば、式(IVa)のガドリニウム錯体と、リシンの $\epsilon$ -アミノ基の反応は、式(IX)及び(X)：



の改質されたリシン残基を生成する。

このような改質された残基の加水分解は、置換の型を確認するのに利用されるN<sup>'</sup>-(3-アミノプロピル)リシン及びN<sup>'</sup>, N<sup>'</sup>-ビス(3-アミノプロピル)リシンを生成する。

追加の例証として、下記の表1は、本発明の特別な有利性を例示し、得られた生成物は、常に1より大きいパラメーター $p$ によって特徴付けられる。



表1. 先行技術と本発明のいくつかの好ましい生成物の特性比較 (F=式(IV))

担体	m	p	n	Gd (wt/w)	参照
(Gd-DTPA) <sub>n</sub> HSA	60	25	35	1	6.5% Vexler, V.S. et al., Invest. Radiol. 1992, 27, 935-941.
(Gd-DTPA) <sub>n</sub> HSA	60	41	19	1	3.3% Ogan M. et al., Invest. Radiol., 1987, 22, 665-671.
(DOTA) <sub>n</sub> シクロクロムc	19	10.21	8.79	1	8.1% Lewis, M.R. et al., Bioconj. Chem. 1994, 5, 565-576.
(Gd-DTPA) <sub>n</sub> PL	136	116	40	1	15.7 Barthezane, Y. et al., Invest. Radiol. 1992, 27, 346-351.
F <sub>2</sub> -Lys(Z)	1	0	2	2	21.3% 本発明の実施例3
F <sub>2</sub> -Lys	2	1	2	2	23.4% 本発明の実施例4
F <sub>3</sub> -Lys	2	0	3	1.5	24.3% 本発明の実施例5
F <sub>4</sub> -Lys	2	0	4	2	24.8% 本発明の実施例6
F <sub>5</sub> -ジエチレントリアミン	2	0	4	2	25.4% 本発明の実施例8
F <sub>2</sub> -ドデシルアミン	1	0	2	2	22.8% 本発明の実施例9
F <sub>2</sub> -[Lys <sup>3</sup> ]ポリベシシン	1	0	2	2	11.3% 本発明の実施例10
F <sub>2</sub> -インスリン	3	0.1	4.6	1.59	8.5% 本発明の実施例11
F <sub>2</sub> -ヒトαグロビン	20	0.5	27.9	1.43	13.5% 本発明の実施例12
F <sub>2</sub> -4-モリブデン/タンパク質	15	0.2	28.2	1.91	10% 本発明の実施例13
F <sub>2</sub> シクロクロムc	19	9	14.6	1.46	10.9% 本発明の実施例14

表は、この技術状態の教示によって得られた生成物が  $p = 1$  によって特徴付けられるのに対し、本発明のそれは  $p > 1$  を有することを明らかに示している（幾つかの場合には、可能な極大値、すなわち2に近く、担体の第一級アミノ基の完全な二置換が得られたことを意味する）。更に、担体分子当りのGdの重量%含量は、同じ担体で比較した時、平均して、本発明の化合物が非常に高かった。実際に、この値は、例えば、完全な錯体化を仮定した場合、ルイスらが記載している (DOTA)<sub>n</sub> シクロクロムc 生成物では8.1%に等しい (Lewis et al., B

ioconj. Chem. 1994, 5, 565-576)、他方、本発明の実施例11に記載したシトクロムcの誘導体では、この値は10.9%である。MRI検査にGdの100  $\mu\text{mol/kg}$ 用量の投与を仮定すると、ルイスらの生成物の場合には、総計で生成物11.4  $\mu\text{mol/kg}$ が投与されるべきであるが、本発明の生成物では6.8  $\mu\text{mol/kg}$  (すなわち、約半分) だけが必要である。事実、同じ著者 (Lewis et al.) は、金属イオンによるキレート化の効率は84.5~97.7%で異なることを立証している (Bioconj. Chem. 1994, 5, 565-576, pg. 567の表1)。本発明の生成物では、この値が100%であることを考慮すると、最終的な利点は明らかに非常に大きい。

本発明の目的である化合物は広い応用分野を有する。特に、磁気共鳴に基づいた診断法の全部で、適切に配合される場合、常磁性金属を含む錯体が使用される。

本発明の目的であるキレートは、核医学においても用いられる。しかしながら、この場合、キレート化される金属イオンは、粒子を放出する放射性同位体、例えば、 $^{51}\text{Cr}$ 、 $^{67}\text{Ga}$ 、 $^{68}\text{Ga}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 $^{140}\text{La}$ 、 $^{175}\text{Yb}$ 、 $^{153}\text{Sm}$ 、 $^{166}\text{Ho}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{149}\text{Pm}$ 、 $^{177}\text{Lu}$ 、 $^{47}\text{Sc}$ 、 $^{142}\text{Pr}$ 、 $^{159}\text{Gd}$ 、 $^{212}\text{Bi}$  である。

本発明の目的である金属錯体は、リボソームに入れてカプセルに包まれ、単層又は多層状の小胞として用いられ、又はアニオン性、親水性で水溶性の「担体」と組み合わせて使用される。この「担体」は、例えば、ヘパリン硫酸、コンドロイチン硫酸、デルマトン硫酸のような硫酸エステル基類を含む糖、オリゴ糖、多糖又はグリコサミノグリカンであり得る。

実験の部において、本発明の幾つかの化合物の製造法を報告する。

#### 実施例1—方法

合成化合物確認のための分析法：

質量分析：

本発明の生成物の質量値は、金属錯体の分析が可能である電子スプレーイオン化 (ESI-MS) 法を用いて測定した。高分子型生成物は、Lasernat 2000 (F

innigan Mat) 装置及びマトリックスとして $\alpha$ -シアノ-4-ヒドロキシケイ皮酸(ACH)又はシナピン酸を使用し、Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation飛行時間法(MALDI-TOF)と称する技術を用いて分析した。

元素分析：

C、H及びNの百分率を標準法によって得た。ガドリニウム含量は、発光分光法(ICP-ES)又はX線蛍光法(XRF)によって測定した。分析を実施する前、試料をマイクロ波装置で完全に鉱化した。

アミノ酸分析：

蛋白を原料にして得られた化合物の場合、アミノ酸の定量分析によって蛋白含量を測定した。生成物を6N塩酸中110℃で、20～48時間加水分解した後、分析を行った。カラムの後にニンヒドリン検出器を備えたCarlo Erba 3A-29分析装置で加水分解物を分析した。

遊離アミノ基の測定：

高分子型の生成物には、“p”パラメーター(抱合後に残っている遊離アミノ基)は、Stocks S.J., Andrew J.W., Ramey C.W., Brooks D.E., Anal. Biochem. 1986, 154(1), 232-234に記載の方法により、フルオレスカミン(fluorescamine)に基づいた評価法を用いて測定した。分析を行っている化合物の反応を、相当する非改質高分子のそれと比較した。蛋白を原料として得られた化合物の場合、アミノ酸の定量分析によって蛋白含量を測定した。非改質蛋白の濃度は、インスリン( $\varepsilon_{277.5nm} = 0.957 \text{ ml} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ )及びキモトリプシノーゲンA( $\varepsilon_{277.5nm} = 2.03 \text{ ml} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ )の場合の吸収係数を基礎にして測定し、ミオグロビン及びシトクロムcには、ビリジンヘモクロモゲン法を用いた(Riggs A., Methods in Enzymol., 1981, 76, 20-21)。

サイズ排除クロマトグラフィー：

蛋白を原料として得られた化合物の場合、生成物の均質性をサイズ排除クロマトグラフィーによって確認した。それぞれの化合物試料を、0.2Mの $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ 溶液で平衡させたSuperdex 75-HR 10/30カラム(Pharmacia社の製品)上に注入(25  $\mu\text{l}$ )した。クロマトグラフィーを低温室(6～7℃)で0.5ml/min

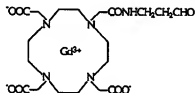
の流速で行い、280nmの分光測定で検出した。

緩和度測定：

幾つかのGd含有生成物では、Bruker Minispec 120を用い、0.5T及び39℃で測定した。

実施例2：

10-[2-オキソ-2-[(3-オキソプロピル)アミノ]エチル]-1,4,7,10-テトラアザシクロドデカン-1,4,7-三酢酸のガドリニウム錯体



A) 10-[2-オキソ-2-[(3-オキソプロピル)アミノ]エチル]-1,4,7,10-テトラアザシクロドデカン-1,4,7-三酢酸〔式(IIIa)〕の化合物]

特許出願の実施例4に記載の方法に準じて(WO第95/32741号、ページ499)、標題の化合物を製造した。製造した。

<sup>1</sup>H-NMR、<sup>13</sup>C-NMR、IR及びMSスペクトルは、表示した構造に一致した。

B) 10-[2-オキソ-2-[(3-オキソプロピル)アミノ]エチル]-1,4,7,10-テトラアザシクロドデカン-1,4,7-三酢酸〔式(IVa)〕の化合物〕のガドリニウム錯体

水3,000mlに溶解した化合物A)の2.9g(0.0063mol)の溶液

に、酸化ガドリニウム1.14g(0.00315mol)を加え、反応混合物を50℃で20時間加熱し、反応の経過をHPLCでモニターした。反応混合物をMillipore(0.45μm)を通して濾過し、濾液を濃縮乾固して、所望の生成物3.85g(0.00627mol)を定量的な収率で得た。m.p. : >280℃。



口酢酸(TFA)(10:90:0.1)の混合溶媒10mlに溶解し、不溶性物質を濾去し、LiChrosorb RP-18 25x250mmカラム(E. Merck社の製品)を用いて製造した。純粋な化合物を、同じCH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O/TFA混合溶媒を用いて溶出した。分析用カラムを用いて同一条件で行った分析に基づいて、均一な画分を併せ、濃縮乾固した。残渣をエーテルで洗い、減圧下に乾燥し、痕跡量のTFAを含む所望の生成物の約1.9grを得た。

K. F. 力価: 3.43%(w/w)。

HPLC力価: 98%(面積における%) :

カラム: LiChrospher 100 RP-18 (5 $\mu$ m) ; 250x4mm (E. Merck社の製品)、

溶出液A: 5mMリン酸緩衝液(pH3)、

溶出液B: CH<sub>3</sub>CN、

10分間10%B; 10分間に10~30%Bの勾配溶離、

流速: 1ml/min。

元素分析:

実験値: C, 33.22; H, 3.88; N, 7.28; Gd, 12.15。

計算値: C, 33.03; H, 3.97; N, 6.80; Gd, 12.72。

ESI-MS: 1,476 (MH<sup>+</sup>)。

生成物の構造を証明するために、生成物を6N塩酸中110℃で20時間加水分解した。加水分解生成物が、N<sup>+</sup>, N<sup>+</sup>-ビス(3-アミノプロピル)リシンであることを、質量分析(MH<sup>+</sup>: 261)及びNMR分析で確認した。LiChrosorb RP-18(25x250mm)カラムを用いたクロマトグラフィーの間に、モノアルキル化生成物を含む画分も採取した。

収率: 14%(200 $\mu$ g)。

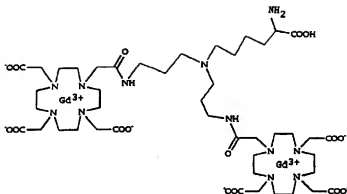
ESI-MS: 879 (MH<sup>+</sup>)。

この実施例に記載した生成物の $\rho$ 比は2であった。

実施例4:

N<sup>+</sup>, N<sup>+</sup>-ビス[4-アザ-5-オキソ-6-(1,4,7,10-テトラアザシクロドデシル-4,7,10-三酢酸)ヘキシル]-L-リシンのガドリニ

ウム錯体



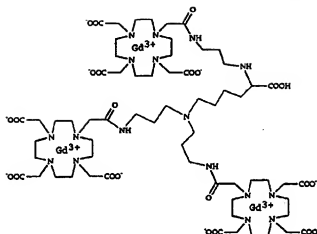
実施例3で得られた化合物0.5gをメタノール50mlに溶解し、この溶液に、20% Pd(OH)<sub>2</sub>/の0.25gを加えて、大気圧下に室温で10分間水素化した。次いで、窒素ガスをフラスコ中に通気し、形成したCO<sub>2</sub>を駆逐した。更に10分間、水素化を続けてから、反応混合物を濾過し、濾液を濃縮した。残渣をエチルエーテルに懸濁し、濾取して乾燥し、400mg(88%)の収量を得た。

ESI-MS: 1,342 (MH<sup>+</sup>)

この実施例に記載した生成物のρ比は2であった。

実施例5:

N<sup>o</sup>, N<sup>e</sup>, N<sup>e(s)</sup> トリス〔4-アザ-5-オキソ-6-(1,4,7,10-テトラアザシクロドデシル-4,7,10-三酢酸)ヘキシル〕-L-エリシンのガドリニウム錯体



実施例 2 B で得られた化合物 (IVa) の 2 g (3.25 mmol) をメタノール 10 ml に溶解し、 $-5^{\circ}\text{C}$  に冷却した。この溶液に、メタノール 4 ml に溶解したリシン塩酸塩 100 mg (0.55 mmol) 及び LiOH の 26 mg (1.1 mmol) の溶液、そして最後に  $\text{NaCNBH}_3$  の 310 mg (4.93 mmol) を加えた。反応混合物を  $-5^{\circ}\text{C}$  で 60 時間攪拌し、この時点で溶媒を留去した。残渣を水 5 ml に溶解して濾過し 0.1 M ピリジン/酢酸 (pH 5.6) で平衡させたイオン交換樹脂 (AG-50W-X4、Bio-Rad 社の製品) を用いて精製造した。余分の生成物 (IVa) 及び反応の副生成物を除去した後、問題の生成物を 1 M ピリジン/酢酸 (pH 5.6) で溶離した。生成物 (TLC: Silica 60-F254、展開溶媒: エタノール/25% アンモニア (1:1);  $R_f = 0.36$ ) を含む画分を併せ、乾燥し、水に溶解して、徹底的に凍結乾燥した。生成物 425 mg (リシンに基づいて 40%) を得た。

MALDI-TOFMS: 1,943 (計算した  $MH^+ = 1,940$ )。

ガドリニウム基準当りの緩和度  $r_1 = 5.25 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ 。

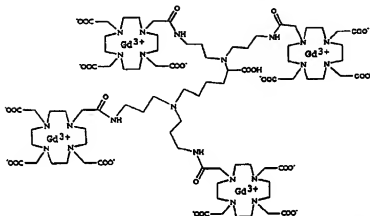
この実施例における生成物の  $\rho$  比は 1.5 であった。

実施例 6:

$N^{\circ}, N^{\circ}, N^{\circ}, N^{\circ}$  -テトラキス [4-アザ-5-オキソ-6-(1,4,7,1



0-テトラアザシクロドデシル-4, 7, 10-三酢酸)ヘキシル]-L-リシンのガドリニウム錯体



実施例2Bに記載の方法で得られた化合物(IVa)の2g(3.25nmol)を、還流冷却器を備えたフラスコ中でメタノール10mlに溶解し、-5℃に冷やした。この溶液に、メタノール3mlに溶解したリシン塩酸塩75mg(0.41nmol)及びLiOHの20mg(0.82nmol)、次いでNaCNBH<sub>3</sub>の310mg(4.93nmol)を加え、この混合物を-5℃で4時間攪拌した後、更に40時間室温(21℃)で攪拌を続けた。その後、メタノール2mlに溶解した化合物(IVa)の0.5g(0.82nmol)及びNaCNBH<sub>3</sub>の77mg(1.23nmol)を加え、この混合物を2時間50℃に加熱してから、室温に17時間放置した。形成した析出物を溶解するために水3mlを加え、この混合物を3時間50℃に再び加熱してから、室温に18時間放置した。溶媒を留去し、残渣を水5mlに溶解して濾過した。濾液を0.1MのNH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>溶液で平衡させたイオン交換樹脂(AG-50W-X4、Bio-Rad社の製品)で精製造した。過剰の生成物(IVa)及び反応の副生成物をカラムから除去した後、0.1~2MのNH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>の勾配溶液で問題の生成物を溶出した。

トリ-及びテトラアルキル化生成物(TLC:Silica 60-F254、展開剤:エ

タノール／25%アンモニア(1:1);  $R_f = 0.36$ )を含む画分を併せ、乾燥してから水3mlに溶解した。これを、LiChrosorb RP-18カラム(250x25mm)を用いた分取用HPLCに付し、0.1%TFAを含む5~20%アセトニトリルの勾配溶媒で溶出して精製した。三置換生成物を含む僅かな画分の後、所望の生成物を含む画分を集め、乾燥してから水に溶解し、徹底的に凍結乾燥した。収量: 90mg。

MALDI-TOF-MS=2,543 ( $MH^+$ 、計算値: 2,538)。

ガドリニウム基準当りの緩和度  $r_1 = 8.35 s^{-1} mM^{-1}$ 。

この実施例に記載した生成物の  $\rho$  比は2であった。

実施例7:

$N^{\alpha}$ -カルボベンジルオキシ- $N^{\epsilon}$ ,  $N^{\epsilon}$ -ビス-[4-アザ-5-オキソ-6-(1,4,7,10-テトラアザシクロデシル-4,7,10-三酢酸)ヘキシル]-L-リシン

実施例2Aに記載の方法で得られた化合物(IIIa)の3g(6.5mmol)及びトリエチルアミン2gを、窒素ガスの雰囲気下、メタノール10mlに溶解して-5℃に冷却した。別に、 $N^{\alpha}$ -カルボベンジルオキシ-L-リシン(Z-リシン)の0.45g(1.6mmol)及びKOHの0.1gを、MeOHの4mlに溶解した溶液を製し、これを、反応フラスコに加え、最後にNaCNBH<sub>3</sub>の0.6g(9.5mmol)を加えた。この混合物を、絶えず攪拌しながら、-5℃に18時間維持した。溶媒を留去し、残渣をCH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O/トリフルオロ酢酸(TFA)(10:90:0.1)の混合溶媒10mlに溶解した。不溶物を濾去し、濾液をLiChrosorb RP-18カラム(250x25mm, E. Merck社の製品)を用い、同じCH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O/TFAの混合溶媒で生成物を溶出して精製した。分析用カラムを用いて同じ条件下で行った分析を基礎にして均質な画分を集め、濃縮乾固した。残渣をエーテルで洗い、減圧下に乾燥して、痕跡量のTFAを含む所望の生成物1.3gを得た。

K. F. 力価: 4.85%(w/w)。

HPLC力価: 96%(面積における%) (実施例3に記載の方法)。

ESI-MSスペクトル: 1,168 ( $MH^+$ )。

同様な方法で、以下の誘導体を得た：

$-N^a$ ,  $N^e$ ,  $N^{(a)}$  トリス〔4-アザ-5-オキソ-6-(1, 4, 7, 10-テトラアザシクロドデシル-4, 7, 10-三酢酸)ヘキシル〕-L-リシン、 $-N^a$ ,  $N^a$ ,  $N^e$ ,  $N^e$  -テトラキス〔4-アザ-5-オキソ-6-(1, 4, 7, 10-テトラアザシクロドデシル-4, 7, 10-三酢酸)ヘキシル〕-L-リシン。

この実施例に記載した生成物を水素化して、次の化合物を得た：

$N^e$ ,  $N^e$  -ビス〔4-アザ-5-オキソ-6-(1, 4, 7, 10-テトラアザシクロドデシル-4, 7, 10-三酢酸)ヘキシル〕-L-リシン。

実施例 8：

1, 1, 4, 7, 7-ペンタキス〔4-アザ-5-オキソ-6-(1, 4, 7, 10-テトラアザシクロドデシル-4, 7, 10-三酢酸)ヘキシル〕-1, 4, 7-トリアザヘプタン

実施例 2 B に記載の方法で得られた化合物 (IVa) の 1.5 g (2.44 mmol) を、0.1 M ホウ酸溶液 10 ml に溶解し、次いで、ジエチレントリアミン 11  $\mu$ l (0.1 mmol) を加えた；この溶液の最終 pH は 8.5 であり、更に調整することを要しなかった。次いで、水素化シアノホウ素ナトリウム 300 mg (4.8 mmol) を加え、この混合物を、窒素ガスの雰囲気下、室温で 6 時間、次いで 37℃ で 60 時間攪拌した。この時点で、濁った反応混合物を透析膜 (Cellusep H1) 公称分離 1000、Membrane Filtration Products 社の製品) に移し、水に対して徹底的に透析した。質量分析は、それぞれジエチレントリアミン-(化合物 IV)、及びジエチレントリアミン-(化合物 IV)。に相当する約 2,500 及び 3,100 に 2 個の主ピークの存在を示した。透析した反応混合物を凍結乾燥し、pH 5.5 の 50 mM リン酸緩衝液、0.1 M の  $Na_2SO_4$  溶液の 1 ml に溶解し、同じ緩衝液で平衡させた Sephadex G-25 のカラム (2.2x120 cm) 載せた。最初のピークを集め、凍結乾燥によって濃縮し、水に対して透析し、最後に凍結乾燥して、十分にアルキル化された誘導体 ( $MH^+$ 、実験値及び計算値 = 3,092) 90  $\mu$ g を得た。

実施例 9：

N, N-ビス-(4-アザ-5-オキソ-6-(1, 4, 7, 10-テトラアザシクロドデシル-4, 7, 10-三酢酸)ヘキシル)ドデシラミンのガドリニウム錯体

実施例2Bに記載した方法で得られた化合物(IVa) 2 g (3.25 mmol)を、窒素ガスの雰囲気下、メタノール10 mlに溶解して-5℃に冷却した。これに、メタノール2 mlに溶解したドデシラミンの125  $\mu$ l (100 mg; 0.54 mmol)の溶液、次いで水素化シアノホウ素ナトリウム310 mg (4.9 mmol)を加え、窒素ガスの雰囲気下、反応混合物を室温で6時間、次いで37℃で60時間攪拌した。溶媒を留去し、残渣をCH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O/トリフルオロ酢酸(TFA)(20:80:0.1)の混合溶媒10 mlに溶解し、この溶液を濾過して不溶物質を除去し、LiChrosorb RP-18のカラム(25x250 mm, E. Merck社の製品)を用いて同じCH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O/TFAの混合溶媒で生成物を溶出した。生成物は、約4カラム容量の溶出後に純粋な形で溶出したが、不純物も連れていなかった。溶媒を濃縮乾固し、残渣をエーテルで洗い、減圧下に乾燥した。痕跡量のTFAを含む所望の生成物450 mgを得た。

K. F. 力価: 3.97%(w/w)。

HPLC力価: 92%(面積%) (実施例3に記載の方法、傾斜溶媒10~50%B液)。

MALDI-TOF-MSスペクトル: 1,384 (計算したMH<sup>+</sup>: 1,382)。

実施例10:

[Lys<sup>3</sup>]-ボンベンシンと化合物(IVa)の抱合体の製法

pH8の0.1Mホウ酸緩衝液5 mlに溶解した[Lys<sup>3</sup>]-ボンベンシン(Sigma社の製品、B1647, M<sub>r</sub>: 1591.8)の5 mgの溶液に、実施例2Bに記載の方法で得られた化合物(IVa)の30 mg及びNaCNBH<sub>3</sub>の5 mgを加えた。この混合物を室温で4時間攪拌した後、更に、化合物(IVa)の30 mg及びNaCNBH<sub>3</sub>の5 mgを加えた。更に20時間攪拌した後、反応混合物を、Cellulosep H1膜(公称分離: 1,000)に入れ、水に対して透析した。得られた溶液を部分的な凍結乾燥によって濃縮し、質量分析によって分析し、化合物

(IVa) による単一ペプチドのアミノ基の二重アルキル化に相当する強いシグナルの存在を2,790 (計算した $MH^+$  = 2,788) に示した。

#### 実施例 11:

##### インスリンと化合物 (IVa) の抱合体の製法

pH 8 の 0.1 M ホウ酸緩衝液 1.3 ml に溶解したブタのインスリンナトリウム塩 (Calbiochem の製品、407696、 $M_r$ : 5778; 10  $\mu$ mol アミノ基) 20 mg の溶液に、実施例 2 B に記載した方法で得られた化合物 (IVa) の 9.5 mg 及び  $NaCNBH_3$  の 1.5 mg を加えた。この混合物を 20 °C で 4 時間攪拌した後、更に化合物 (IVa) の 9.5 mg 及び  $NaCNBH_3$  の 1.5 mg を加えた。

抱合反応は、存在するアミノ基に対して化合物 (IVa) を 30 : 1、 $NaCNBH_3$  と化合物 (IVa) を 1.5 : 1 の総モル比で行った。室温で 16 時間放置後、Sephacryl S-100HR カラム (Pharmacia 社の製品) を用いたサイズ排除クロマトグラフィーによって、過剰の試薬及び反応の副生成物から抱合体を分離した。このカラム (45x8.9cm) を、0.1 M の  $NH_4HCO_3$  溶液により 2.0 ml/min の流速で溶出した。最終生成物を濃縮し、限外濾過/Amicon YM-3 膜による透析濾過によって脱塩した。

サイズ排除クロマトグラフィーによって分析し、生成物は均質であった ( $t_r$ : 24.99 分)。フルオレスカミンによる処理は、蛋白 1 mol 当り 0.1 mol  $NH_2$  基のみの存在を示した。Gd 含量は、蛋白 1 mol 当り 4.6 mol であった。質量分析は、インスリンの質量プラス化合物 (IVa) の、それぞれ、2、3、4 及び 5 残基の質量を示した。アミノ酸分析は (参照: 表 2)、1 単位が少ないアミノ酸リシン、グリシン及びフェニルアラニンを除いて、非改質インスリンの組成との極めてよい一致を示した。後者の二つのアミノ酸は、インスリンの二つの鎖のアミノ末端であるので、これは、 $\alpha$ -及び  $\epsilon$ -アミノ基の両方が反応に関与することを確証した。僅かな量のシステインが観察されたが、このアミノ酸の加水分解の条件下での典型的な不安定性によるものであり、考慮しなかった。

表2.インスリン化合物(IVa)抱合体のアミノ酸分析

	理論値	実験値	D
			(実験値と理論値の差)
Asx	3	3.04	0.04
Thr	2	1.94	-0.06
Ser	3	2.70	-0.30
Pro	1	1.27	0.27
Glx	7	7.29	0.29
Gly	4	3.09	-0.91
Ala	2	1.99	-0.01
Cys	6	4.53	-1.47
Val	4	4.30	0.30
Met	-	-	
Ile	2	1.87	-0.13
Leu	6	5.97	-0.03
Tyr	4	3.92	-0.08
Phe	3	2.09	-0.91
His	2	1.99	-0.01
Lys	1	0.17	-0.83
Arg	1	0.99	-0.01

この実施例に記載された生成物の $\rho$ 比は1.59であった。

実施例12:

ミオグロビンと化合物(IVa)の抱合体の製法

ウマの心臓ミオグロビン(Sigma社の製品、M-1882、M<sub>r</sub>=17567)及びpH8.5のホウ酸緩衝液を用い、実施例11と同様に製造した。使用した量は:

緩衝液100mlに溶解したミオグロビン(0.56mmol NH<sub>2</sub>)0.5g、実施例2Bで得た化合物(IVa)10.37g(16.9mmol)を2回に分けて添加、

NaCNBH<sub>3</sub>の1.6g(25.4mmol)を2回に分けて添加。

生成物は、サイズ排除クロマトグラフィー ( $t_R$ : 19.58分) により均質であることを示した。フルオレスカミンによる処理は、蛋白1mol当り0.5mol  $\text{NH}_2$ 基のみの存在を示した。Gd含量は、蛋白1mol当り27.9molであった。質量分析は、ミオグロビンの質量プラス化合物(IVa)の、それぞれ、29~33残基の質量を示した。

合成した化合物の蛋白含量を測定するのに用いたアミノ酸分析は、19個の残基がある代わりに、ゼロに近いことが示されたリシンを除いて、処理されたミオグロビンの組成が非改質ミオグロビンの組成との極めてよい一致を示した。

ガドリニウム基準当りの緩和度 $r_1 = 19 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ 。

この実施例に記載された生成物の $\rho$ 比は1.43であった。

実施例13:

キモトリプシノーゲンAと化合物(IVa)の抱合体の製法

ウシの膵臓キモトリプシノーゲンA (E. Merck社の製品、2306、 $M_r=25656$ )及びpH9のホウ酸緩衝液を用い、実施例11と同様に製造した。使用した量は:

緩衝液100mlに溶解したキモトリプシノーゲンA (0.29mmol  $\text{NH}_2$ )の0.5g、実施例2Bで得た化合物(IVa)の5.38g (8.77mmol)を2回に分けて添加、

$\text{NaCNBH}_3$ の0.82g (13.2mmol)を2回に分けて添加。

生成物は、サイズ排除クロマトグラフィー ( $t_R$ : 19.55分) により均質であることを示した。フルオレスカミンによる処理は、蛋白1mol当り0.2mol  $\text{NH}_2$ 基のみの存在を示した。Gd含量は、蛋白1mol当り28.2molであった。質量分析は、キモトリプシノーゲンAプラス化合物(IVa)の26.6残基の質量を示した。

合成した化合物の蛋白含量を測定するのに用いたアミノ酸分析は、14残基がある代わりに、ゼロに近いことが示されたリシンを除いて、処理されたキモトリプシノーゲンAの組成が非改質キモトリプシノーゲンAの組成との極めてよい一致を示した。

この実施例に記載された生成物の $\rho$ 比は1.91であった。

## 実施例14:

## シトクロムcと化合物(IVa)の抱合体の製法

ウマの心臓シトクロムc (Sigma社の製品、C-7752、 $M_r=12360$ ) を用い、実施例11と同様に製造した。使用した量は:

緩衝液10mlに溶解したシトクロムc ( $3.2 \mu\text{mol NH}_2$ ) の20mg、実施例2Bで得た化合物(IVa) 0.55g ( $0.9 \text{mmol}$ ) を2回に分けて添加、

NaCNBH<sub>3</sub>の100mg ( $1.6 \text{mmol}$ ) を2回に分けて添加。

カラムによる精製に先立ち、最初に、反応混合物をホウ酸緩衝液に対して透析し、未反応のNaCNBH<sub>3</sub>を除き、次いで、フェリシアン化カリウム(最終濃度5mM)で処理し、ヘム基のフェロイオンを再酸化した。

生成物は、立体排除クロマトグラフィーにより均質であることを示した。フルオレスカミンで生成物を処理することは、ヘム基の部分での障害のために不可能であったので、遊離アミノ基をTNBS (Habeeb A.F.S.A. Anal. Biochem., 1966, 14, 328-336) で測定し、蛋白1mol当り9molNH<sub>2</sub>基の値を示した。Gd含量は、蛋白1mol当り14.6molであった。質量分析は、範囲の広いシグナルを示し、その中でシトクロムc プラス化合物(IVa)の15、16及び17残基の質量に相当する3ピークを認めた。

この実施例に記載された生成物のpIは1.46であった。

## 実施例15:

## インスリンと化合物2A)の抱合体の製法

pH8の0.1Mホウ酸緩衝液7mlに溶解したブタのインスリンナトリウム塩(Calbiochem社の製品、407696、 $M_r:5778:5$ 、 $2 \mu\text{mol}$ アミノ基)の10mgの溶液に、化合物2A)の70mg ( $0.155 \text{mmol}$ )を加え、1N水酸化ナトリウム溶液でpHを8に維持した。次いで、NaCNBH<sub>3</sub>の15mgを加え、この混合物を室温で20時間絶えず攪拌した。

反応混合物を限外濾過(Amicon YM-3膜)して濃縮し、Sephacryl S-100HRカラム(Pharmacia社の製品)に載せ、0.15MのNH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>溶液を用い、1ml/minの流速で溶出した。最終生成物の画分を濃縮し、Amicon YM-3膜を用いた限外濾過/透析濾過により脱塩した。



生成物を、立体排除クロマトグラフィーによって分析し、均質であることを示した。フルオレスカミンによる処理は、蛋白1 mol当り0.3 mol NH<sub>2</sub>基のみの存在を示した。

質量分析は、インスリンプラス化合物2 A)の、それぞれ、2、3及び4の残基の質量に相当するシグナルを示した。

このシグナルを積分することによって、置換の平均数は3.4であると算定した。この実施例に記載した生成物の $\rho$ 比は1.26であった。

同様な方法を用いて、次の誘導体を製造した：

- 〔式II〕 ミオグロビン、
- 〔式II〕 シトクロムc、
- 〔式II〕 キモトリプシノーゲンA。

実施例16：

ポリリシンと化合物2 A)の抱合体の製法

pH8の0.1 Mホウ酸緩衝液7 mlに溶解したポリリシンプロモヒドレート(Signa社の製品、P0879、M<sub>r</sub>:1000-4000;平均10個のLys残基及びM<sub>r</sub>:2108と仮定して、52  $\mu$ molアミノ基)の10 mgの溶液に、化合物2 A)の1 g (1.6 mmol)を加え、1 N水酸化ナトリウム溶液でpHを8に維持した。次いで、NaCNBH<sub>3</sub>の150 mgを加え、この混合物を室温で72時間絶えず攪拌した。

反応混合物を、Sephacryl S-100HRカラム(Pharmacia社の製品)に載せ、このカラム(8.9x45cm)を、0.15 MのNH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>溶液を用い、20 ml/minの流速で溶出した。最初のピークを含む画分を濃縮し、次いで、凍結乾燥した(52 mg)。

質量分析(MALDI-TOF)は、ポリリシンプラス化合物2 A)14単位の平均質量に相当する約9,600を中心として、7,000~13,000の領域に広く分布したシグナルを示した。

フルオレスカミンによる処理は、M<sub>r</sub>=9,600と仮定して、蛋白1 mol当り1.2 mol NH<sub>2</sub>基のみの存在を示した。

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inventor Application No  
PCT/EP 97/01048

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 6 C07D257/02 C07C229/16 A61K49/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. PUBLISHER SEARCHED</b> Information systems followed by classification applied IPC 6 C07D C07C A61K		
Document(s) searched other than machine document(s) to the extent that such document(s) are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of documents, with indications, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	FR 2 596 992 A (GUERBET SA.) 16 October 1987 see claims	1-23
A	EP 0 661 279 A (GUERBET SA.) 5 July 1995 see claims	1-23
A	WO 95 27705 A (BRACCO INTERNATIONAL B.V.) 19 October 1995 see claims	1-23
-----		
<input type="checkbox"/> Further documents are cited in the communication of this C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
<b>* Special categories of cited documents:</b>		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may have priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document relating to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and run in parallel with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other cited documents, each combination being obvious to a person skilled in the art "M" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 15 May 1997		Date of mailing of the international search report 27.05.97
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 1615, Postfach 2 101 - 220 117 Europe Tel (+31 70) 240-2040, Telex 31 431 epo nl, Fax (+31 70) 240-2044		Authorized officer Chouly, J

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

 Note: see Applicant's No.  
 PCT/EP 97/01048

Patent documents cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR 2596992 A	16-10-87	AU 591774 B	14-12-89
		AU 7235087 A	09-11-87
		EP 0263861 A	20-04-88
		WO 8706229 A	22-10-87
		JP 7113632 B	06-12-95
		JP 63583662 T	10-11-88
		US 4877686 A	31-10-89
EP 661279 A	05-07-95	AU 8178894 A	06-07-95
		CA 2139374 A	01-07-95
		CN 1116974 A	01-11-95
		CZ 9403322 A	12-07-95
		FI 946157 A	01-07-95
		JP 7224050 A	22-08-95
		NO 945069 A	03-07-95
		NZ 270289 A	26-05-96
		ZA 9410382 A	29-06-96
WO 9527705 A	19-10-95	EP 0702677 A	27-03-96
		JP 0511809 T	10-12-96
		US 5573752 A	12-11-96

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	FI	テーマコード(参考)
C O 7 D 257/02		C O 7 F 5/00	D
C O 7 F 5/00		A 6 1 K 49/02	C
(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG), UA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU			